

ANÁLISIS DEL DESARROLLO DE *LISTERIA MONOCYTOGENES* EN UN PRODUCTO CÁRNICO SOMETIDO A ALTA PRESIÓN HIDROSTÁTICA

Giménez Belén (1), Graiver Natalia (1), Giannuzzi Leda (1), Zaritzky Noemí (1,2)

(1) Centro de Investigación y Desarrollo en Criotecnología de Alimentos (CIDCA), CONICET, Fac. de Ciencias Exactas, UNLP, La Plata, Buenos Aires Argentina.

(2) Depto. Ingeniería Química, Fac. de Ingeniería, UNLP, La Plata, Buenos Aires Argentina.
belengimenez@live.com.ar, nataliagraiver@hotmail.com, zaritzkynoemi@gmail.com

INTRODUCCIÓN

Una de las tecnologías emergentes en preservación de alimentos con un gran potencial en el área de productos cárnicos que podría usarse para el control de microorganismos es la alta presión hidrostática (APH), que es un proceso no térmico de preservación con mínimos efectos en el contenido nutricional de los alimentos. El tratamiento de APH por encima de 300 MPa a temperatura ambiente puede mejorar la seguridad microbiológica y extender la vida útil del producto (Balasubramaniam y Farkas, 2008 y Carlez *et al.*, 1994). Asimismo, el tratamiento APH conserva mejor el sabor que el tratamiento térmico, ya que sólo afecta a enlaces no covalentes (Cheftel y Culioli, 1997). La eficacia del proceso depende de parámetros tecnológicos como la presión, mantenimiento de temperatura y tiempo, así como del tipo y estado fisiológico de los microorganismos, y de las propiedades intrínsecas del alimento (pH, aw) (Bover-Cid *et al.*, 2011; Hugas *et al.*, 2002; Hereu *et al.*, 2012; Jofré *et al.*, 2009). En el caso de carne bovina el tratamiento de APH afecta los parámetros de color, atenuando significativamente la tonalidad roja característica. La decoloración en carnes frescas pigmentadas es producida a niveles superiores a 300 MPa, por lo cual se necesita un tratamiento previo de la carne bovina con preservadores químicos que permite la formación de nitrosomioglobina, una proteína que tiene la característica de ser más resistente a las altas presiones, manteniendo un color adecuado en la superficie del producto.

Las Enfermedades Transmitidas por Alimentos (ETA) constituyen uno de los problemas de salud de mayor importancia, tanto en los países desarrollados, como en los países en vías de desarrollo. La Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y Alimentación (Food and Agriculture Organization, FAO) y la Organización Mundial de la Salud (OMS) están preocupadas por el aumento en la incidencia de estas enfermedades en las últimas décadas. El desarrollo de nuevos productos alimenticios y nuevas tecnologías de procesamiento, el uso de sistemas centralizados de distribución rápida y el aumento del comercio internacional, representan un desafío tanto para la industria como para los organismos de control. Los cambios de hábitos y tendencias de consumo, la existencia de poblaciones especialmente susceptibles debido al envejecimiento, la desnutrición, personas inmuno-suprimidas, niños, mujeres embarazadas y los cambios en las poblaciones microbianas también representan un riesgo desde el punto de vista de las ETA (Alvarez Martínez, 2007).

La listeriosis, cuyo agente etiológico es *Listeria monocytogenes*, es una de las principales enfermedades de transmisión alimentaria y de mayor relevancia en la salud pública, debido al impacto social y económico que tiene por la gravedad de su cuadro clínico. (Muñoz *et al.*, 2011). *Listeria monocytogenes* es un microorganismo ubicuo que sobrevive mucho tiempo en los alimentos, por lo cual constituye una gran preocupación para la industria agroalimentaria. Las bacterias pertenecientes al género *Listeria* son bacilos Gram-positivos cortos, regulares, aerobio o anaerobio facultativo, no esporulados ni ramificados, que suelen observarse en disposición individual o formando cadenas cortas. Presentan de 1 a 5 flagelos peritricos que les confieren movilidad a 28°C. Las colonias son pequeñas (de 1 a 2 mm tras uno o dos días de incubación) y lisas. Su temperatura óptima de crecimiento está entre 30°C y 37°C. Se lo considera un patógeno psicrótrofo, capaz de desarrollar a

temperaturas de refrigeración (0-8°C), puede crecer a 4°C en pocos días a diferencia de otras bacterias patógenas como *Salmonella* o *Staphylococcus aureus*, que son inhibidas en su crecimiento a bajas temperaturas y además es capaz de desarrollarse a pH de 4,4 a 9,6 (Muñoz *et al.*, 2011). Asimismo, crece en concentraciones altas de NaCl 10% y sobrevive a concentraciones entre 16 y 20%. (Marzocca, *et al.* 2004).

El patógeno a pesar de no formar endosporas es capaz de sobrevivir por largos periodos de tiempo en el medio ambiente, en las plantas procesadoras de alimentos y en el interior de los refrigeradores. A pesar de encontrarse con frecuencia en alimentos crudos, los casos de listeriosis generalmente se relacionan con aquellos productos listos para el consumo, los cuales se conservan refrigerados por un periodo prolongado de tiempo o con los alimentos contaminados después del procesamiento térmico (FAO, 2000).

El objetivo de este trabajo fue estudiar el efecto de APH sobre el color y el desarrollo de *Listeria monocytogenes* inoculada en carne bovina sometida a un pre-tratamiento con preservadores químicos durante un almacenamiento refrigerado a 4°C y 10°C.

MATERIALES Y MÉTODOS

Materia prima. Para el ensayo se utilizaron cortes de músculos aductor femoris y semimembranoso (nalga). Los músculos se separaron luego de 48 horas postmortem y se eliminó grasa visible y se extrajeron discos (diámetro 6cm y espesor 3mm). Las materias primas tenían un valor de pH entre 5.4 y 5.7.

Tratamiento químico. El proceso involucró un tiempo de difusión de sales en secciones de carne bovina, que se sumergieron durante 2.5 h en la solución de inmersión compuesta por: 0.62g/L NaNO₂, 8.5g/L ácido ascórbico y 30g/L NaCl.

Preparación del inóculo y proceso de inoculación. Se realizó un ensayo con muestras que fueron inoculadas con *Listeria monocytogenes* cepa L261, (cultivo provisto por la Facultad de Ciencias Veterinarias de la UNLP). Inicialmente se realizó la activación de la cepa, para ello se descongelaron las mismas, se tomó 1 ml del cultivo y se sembró en un tubo con TSB (caldo triptona soja), se incubó por 24 h a 37°C. Al día siguiente, se tomó 1 ml del caldo crecido y se sembró nuevamente en un tubo con TSB. Se realizaron 3 repiques.

Posteriormente a la etapa de tratamiento químico de la muestra, se inoculó cada una de forma individual con 100 µl de un cultivo de 24 h de *L. monocytogenes*. El ensayo se llevó a cabo utilizando dos concentraciones de inóculo 10³ y 10⁵ UFC/gramo de tejido cárnico.

Envasado de las muestras. Las muestras de carne inoculadas, y las muestras sin inocular se envasaron individualmente al vacío en bolsas Cryovac BB4L (Sealed Air, Buenos Aires, Argentina), y se sometieron al proceso de alta presión hidrostática (APH).

Aplicación de Alta presión Hidrostática (APH). El tratamiento de APH se llevó a cabo en un sistema de Stansted Fluid Power (modelo FPG9400:922, cilíndrico de 2 litros de capacidad, presión máxima de trabajo 900MPa, rango de temperatura: de -20 a 120 °C) en el Laboratorio del INTA Castelar. La velocidad de presurización con la que operó el equipo fue de 300 MPa/min y la despresurización se realizó instantáneamente. Se utilizaron dos niveles de presión 400 y 600 MPa. El tiempo de proceso de APH fue de 5 min. La temperatura de trabajo fue 20°C ± 5°C.

Almacenamiento refrigerado. Luego del tratamiento de las muestras se almacenaron refrigeradas a 4°C y 10°C. Se incluyeron dos controles: 1) CF: discos de carne inoculadas y no presurizadas y 2) CS: carne sometida al tratamiento químico, inoculada y no presurizada.

Determinaciones de cloruro y nitrito. La cantidad de NaCl presente en el tejido después del tratamiento se determinó mediante un electrodo selectivo (Cole-Parmer 27.502-12) y la determinación de nitrito se llevó a cabo utilizando el kit Hach Nitriver 3 (método 371), según Graiver *et al.* (2006).

Determinación de parámetros de color. Se realizó con un colorímetro triestímulo Minolta C400 el cual utiliza la escala de color CIE Lab*, mediante la cual el color es descrito por los parámetros de luminosidad L*, y de cromaticidad a* y b*. Las determinaciones se realizaron semanalmente sobre 3 rodajas de carne, obteniendo 6 medidas para cada muestra.

Actividad acuosa. Se evaluó el efecto del tiempo de almacenamiento que y la APH sobre la aw de las muestras. Se realizó en un equipo Aqua Lab Serie 3 (Decagon Devices, USA)

calibrado con una solución de K_2SO_4 ($aw = 0.979 \pm 0.005$) y agua bidestilada ($aw=1$). Las medidas fueron realizadas a $25^\circ C$ por duplicado.

Análisis microbiológicos. Semanalmente se analizó el desarrollo microbiano de *L. monocytogenes* en los productos mediante recuento en placa (medio PALCAM) agar PALCAM, que contiene cloruro de litio, polimixina B, acriflavina y ceftazidima. Se incubaron las placas durante 24 horas a $37^\circ C$. Se utilizó para los ensayos microbiológicos carne fresca inoculada como control. Además se realizó un ensayo de presencia-ausencia en los casos donde no se encontró desarrollo de *Listeria*. El método de cultivo convencional consta de un procedimiento de enriquecimiento basado en la utilización de medios de cultivo líquidos que contengan agentes selectivos para tratar de recuperar las células de *L. monocytogenes* en estado subletal. Se pesaron 25 g de la muestra en una bolsa de stomacher, se agregó 225 ml de caldo TSB al que se le adicionó acriflavina, ácido nalidíxico y cicloheximida y se homogeneizó durante 2 minutos \pm 0.2 minutos en Stomacher. Se incubó durante 24 h \pm 2 h a $37^\circ C \pm 2^\circ C$. Se trabajó con 2 dos concentraciones de inóculo 10^3 y 10^5 UFC/g de *L. monocytogenes*.

Análisis estadístico. Los análisis estadísticos fueron realizados utilizando el software SYSTAT (SYSTAT Inc., 1990, v. 10.0). Las diferencias significativas entre las medias fueron determinadas por el método de la menor diferencia significativa, LSD ($P < 0.05$).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Concentración de nitrito y cloruro. Las concentraciones de nitrito de sodio y cloruro de sodio en las muestras cárneas luego del tratamiento fueron: 0.0017 ± 0.0011 g $NaNO_2$ /100 g tejido y 1.67 ± 0.05 g $NaCl$ /100g tejido cárneo para muestras sometidas a 400 MPa y 0.0016 ± 0.0005 g $NaNO_2$ /100 g tejido y 1.73 ± 0.09 g $NaCl$ /100g tejido cárneo para muestras sometidas a 600 MPa, cumpliéndose con lo que establecido en la normativa vigente. El uso de nitrito de sodio, nitrato de potasio o de su combinación no debe superar los 200 ppm (0.2 mg / g), expresado en nitrito de sodio en el producto final (USDA-FSIS 1999).

Actividad acuosa. Se observó que tanto las presiones empleadas, la temperatura y el tiempo de almacenamiento refrigerado no influyeron significativamente en la actividad acuosa del producto, siendo el valor medio de 0.9857 ± 0.0009 .

Color. En trabajos previos (Giménez *et al.* 2014) se observó que al someter las muestras cárnicas a APH sin aplicar ningún tratamiento químico previo se perdía el color rojo característico de la carne bovina obteniéndose un resultado inaceptable para el consumidor. Sin embargo el tratamiento químico propuesto del producto cárnico previo al APH, permite la formación de nitrosomioglobina manteniendo un color adecuado en la superficie del producto, ya que es un pigmento más estable a las altas presiones debido a su mayor resistencia a la oxidación comparado con la mioglobina y la oximioglobina (Rubio *et al.*, 2007). Del análisis de varianza realizado se encontró que la luminosidad L^* se vio afectada significativamente tanto por el tiempo de almacenamiento como por las presiones ensayas no siendo significativa la temperatura. Las interacciones dobles entre estas variables afecta significativamente este parámetro. Las muestras sometidas a 400 MPa presentaron un menor valor de L^* que las muestras sometidas a 600 MPa (**Figura 1 a, b**) a ambas temperaturas de almacenamiento, esto concuerda con lo expuesto por Bak *et al.* (2012) quien reportó que el aumento de la presión por encima de 300 MPa conduce a un pequeño aumento en la luminosidad. El parámetro a^* dependió significativamente ($P < 0.05$) de la presión ensayada, de la temperatura de almacenamiento, del tiempo y de la interacción entre estos tres factores. En función de las presiones, las muestras tratadas a 400 MPa presentaron un mayor valor de a^* comparadas con las muestras tratadas a 600 MPa; esto se debe al efecto de las altas presiones sobre las proteínas sarcoplásmicas. A ambas presiones se produjo una disminución del parámetro a^* durante el tiempo de almacenamiento.

En función de la temperatura, se observó que las muestras almacenadas a $4^\circ C$ presentaron un mayor valor de a^* que las muestras almacenadas a $10^\circ C$. Sin embargo en todos los casos, los valores obtenidos de a^* para las diferentes condiciones estaban en el rango entre 13.82 ± 0.43 y 20.14 ± 0.26 , siendo adecuados para el producto

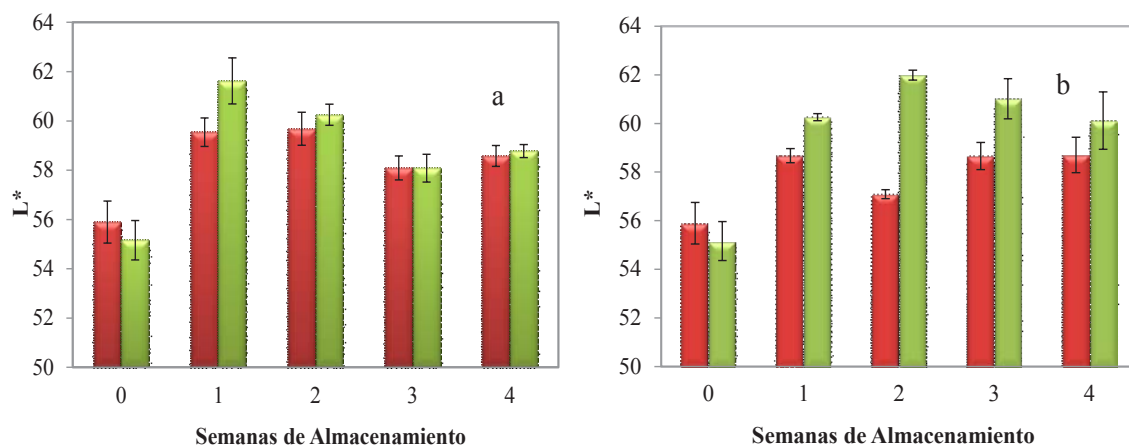


Figura 1: Variación de la luminosidad (L^*) de las muestras cárnicas en función del tiempo para las presiones: (—) 400MPa y (—) 600MPa, almacenadas a las temperaturas: a) 4°C y b) 10°C.

desarrollado. También se midieron los parámetros L^* , a^* en la muestra sin tratamiento (carne fresca, CF) obteniéndose los valores: $L^* 39.59 \pm 0.15$, $a^* 20.28 \pm 0.12$

Análisis microbiológicos. El crecimiento de *L. monocytogenes* en alimentos viene influenciado por factores intrínsecos (pH, a_w , nutrientes, etc.) propios del alimento y extrínsecos (temperatura, humedad relativa, etc.) propios de zona de procesamiento y almacenamiento. Asimismo, su crecimiento también viene determinado por la presencia de algunos compuestos como el NaCl, el lactato o los nitratos y nitritos (Vitas *et al.*, 2004), presentes en la composición de productos cárnicos. La **Figura 2 a, b** corresponde a muestras inoculadas con 10^3 UFC/g y almacenadas a dos temperaturas diferentes 4°C (**Fig 2 a**) y 10°C (**Fig 2 b**). Se puede observar que las muestras tratadas con la solución de aditivos químicos, inoculadas y sometidas a APH en los dos niveles de presión y almacenadas tanto a 4°C como a 10 °C, presentaron recuentos por debajo del límite de detección (2 log UFC/g) lo cual significa que las altas presiones afectaron a las bacterias, impidiendo así su desarrollo normal. Debe señalarse la notoria disminución del recuento inicial después del tratamiento con altas presiones disminuyendo la concentración microbiana en alrededor de 3 ciclos logarítmicos.

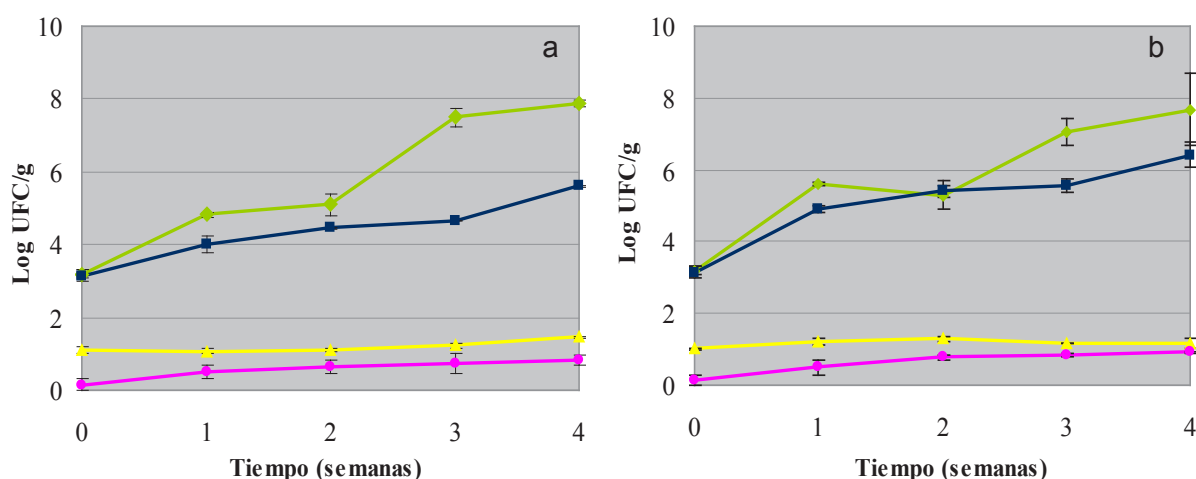


Figura 2: Recuentos de *Listeria monocytogenes* durante el almacenamiento a) 4°C y b) 10°C, de (●) carne fresca, (■) carne sumergida en la solución de aditivos químicos, (▲) carne sumergida en la solución de aditivos químicos y sometida a 400 MPa y (■) carne sumergida en la solución de aditivos químicos y sometida a 600 MPa.

En cambio las muestras frescas (CF) y las tratadas con la solución de aditivos químicos

(CS) que fueron inoculadas, presentaron un recuento por encima de 3 log UFC/g, aumentando a lo largo del almacenamiento refrigerado. En el caso de las muestras almacenadas a una temperatura de refrigeración de 10°C, se observó un crecimiento mayor.

La **Figura 3** corresponde a muestras inoculadas con 10^5 UFC/g y almacenadas a dos temperaturas: 4°C (**Fig 3 a**) y 10°C (**Fig 3 b**). En el caso de las muestras tratadas con APH se observa que las muestras sometidas a 600 MPa presentaron un menor crecimiento que las muestras sometidas a 400 MPa, evidenciando el mayor efecto que produce las altas presiones sobre las bacterias, sin embargo el hecho de tener una mayor cantidad de inóculo inicial podría provocar un efecto de protección en las bacterias que permitiría luego el crecimiento de las mismas durante el almacenamiento. Con respecto a las temperaturas de almacenamiento, no se observó crecimiento a 4°C para las muestras tratadas a 600 MPa durante todo el período y en el caso de las muestras tratadas a 400 MPa, durante la primera semana no se registró crecimiento microbiano. En cambio a 10°C, se notó crecimiento durante la primera semana para 400 MPa y luego de la segunda semana para el tratamiento de 600 MPa, llegando a una concentración final igual para todas las muestras. Se observa que las bacterias que fueron sometidas a APH presentan una cinética de crecimiento distinta a la de las muestras no sometidas a altas presiones; esto podría deberse a una adaptación de la bacteria luego de estar expuesta a condiciones adversas.

Bozoglu *et al* (2004) estudiaron el efecto de la alta presión hidrostática sobre la *L. monocytogenes* y encontraron que luego de un tratamiento a 450 y 550 MPa estas bacterias se vieron afectadas, pero durante el almacenamiento refrigerado a 4°C hay un proceso completo de reparación que podría deberse a la naturaleza psicrotrófica de dichas bacterias. Si bien no se conocen aún los sitios en que se producen los daños celulares de las bacterias, podrían afectarse por la APH la pared celular, la membrana citoplasmática, ADN, ARN y ciertas enzimas dependiendo de la cepa específica.

Con respecto a las muestras frescas (CF) y las tratadas con la solución de aditivos químicos (CS) que fueron inoculadas, éstas presentaron un mayor recuento al inicio y se obtuvo al término del almacenamiento una concentración final similar a la presentada por las muestras inoculadas con una menor concentración de bacterias.

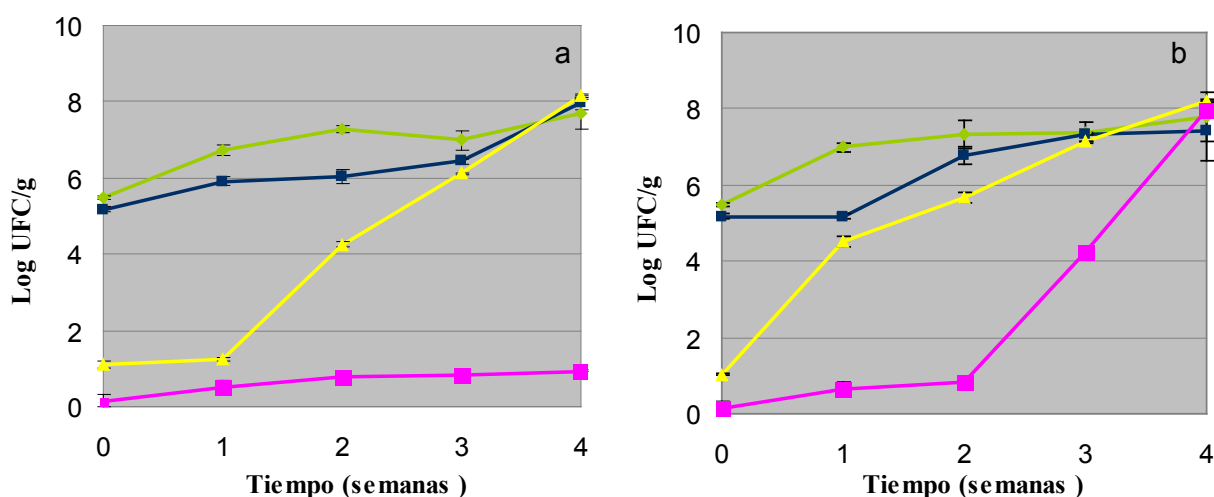


Figura 3: Recuentos de *Listeria monocytogenes* durante el almacenamiento a: a) 4°C y b) bacterias 10°C, de: (●) carne fresca, (■) carne sumergida en la solución de aditivos químicos, (▲) carne sumergida en la solución de aditivos químicos y sometida a 400 MPa y (■) carne sumergida en la solución de aditivos químicos y sometida a 600 MPa.

Para ambas concentraciones de inóculo se observa que el crecimiento de *Listeria monocytogenes* durante el almacenamiento refrigerado, a las dos temperaturas 4 y 10°C, en la carne con el pretratamiento químico es similar al obtenido en la carne fresca, por lo que

podemos concluir que el tratamiento químico previo no produce un efecto bacteriostático; esto podría deberse a la capacidad de este patógeno a crecer en elevadas concentraciones de NaCl y a la baja concentración de nitrito en la muestra. Estos resultados concuerdan con lo observado por Myers *et al.* (2013). Las recomendaciones del Código Alimentario Argentino (CAA) para asegurar la calidad de este tipo de productos son que se debe tener ausencia de *L. monocytogenes* en 25 g de muestra. En el ensayo de presencia-ausencia realizado en las muestras donde no se observó desarrollo, luego del enriquecimiento y siembra en placa se encontró la presencia de *Listeria monocytogenes*, por lo que podemos concluir que el tratamiento de alta presión hidrostática no elimina este patógeno de las muestras cárnicas, sino que dependiendo de la presión aplicada produce daño que puede repararse durante el almacenamiento.

CONCLUSIONES

Se puede concluir que la utilización de APH como procedimiento de control del desarrollo de *Listeria monocytogenes* en un producto cárnico fue efectivo para disminuir los recuentos iniciales después del tratamiento.

Durante las primeras dos semanas de almacenamiento en todas las condiciones ensayadas, se observó disminución de la carga bacteriana inicial, siendo más eficiente el tratamiento a 600 MPa que a 400 MPa. Además se concluye que los parámetros de color de las muestras cárnicas se modificaron debido al proceso de APH y el almacenamiento refrigerado, aunque presentaron valores adecuados para su consumo.

BIBLIOGRAFÍA

- Alvarez Martínez N. Virulencia, resistencia y elementos genéticos móviles en serotipos no prevalentes de Salmonella entérica. Tesis doctoral 2007. Departamento de Biología Funcional Área de Microbiología. Universidad de Oviedo, España
- Bak, K. H., Lindahl, G., Karlsson, A. H., Lloret, E., Ferrini, G., Arnau, J., Orlén, V. (2012). High pressure effect on the color of minced cured restructured ham at different levels of drying, pH, and NaCl. *Meat Science*, 90: 690–696.
- Balasubramaniam, V. M., & Farkas, D. (2008). High-pressure food processing. *Food Science and Technology International*, 14, 413–418
- Bover-Cid, S., Belletti, N., Garriga, M., Aymerich, T. (2011). Model for *Listeria monocytogenes* inactivation on dry-cured ham by high hydrostatic pressure processing. *Food Microbiology*, 28: 804-809.
- Bozoglu F., Hami A., Gönül K. (2004). Injury recovery of foodborne pathogens in high hydrostatic pressure treated milk during storage. *FEMS Immunology and Medical Microbiology*, 40: 243-247
- Carlez, A., Rosec, J. -P., Richard, N., & Cheftel, J. -C. (1994). Bacterial growth during chilled storage of pressure-treated minced meat. *Lebensmittel-Wissenschaft und Technologie*, 27, 48–54.
- Cheftel, J.C., Culioli, J. (1997). Effects of high pressure on meat: A review. *Meat Science*, 46: 211–236.
- Código Alimentario Argentino. Capítulo 6. Alimentos cárneos y afines. Artículo 286 tris - (Resolución Conjunta SPReI N°178/2012 y SAGyP N° 714/2012).
- Giménez, B., Graiver, N., Califano, A., Zaritzky, N. (2015). Physicochemical characteristics and quality parameters of a beef product subjected to chemical preservatives and high hydrostatic pressure. *Meat Science*, 100, 179–188
- Hereu A., Bover-Cid S., Garriga M., Aymerich T. (2012). High hydrostatic pressure and biopreservation of dry-cured ham to meet the Food Safety Objectives for *Listeria monocytogene*. *International Journal of Food Microbiology*, 154: 107–112
- Hugas, M., Garriga, M., Monfort, J. M. (2002). New mild technologies in meat processing: high pressure as a model Technology. *Meat Science*, 62: 359-371.
- Jofré, A., Aymerich, T., Grèbol, N., Garriga, M. (2009). Efficiency of high hydrostatic pressure at 600 MPa against food-borne microorganisms by challenge tests on convenient meat products. *Food, Science and Technology*, 42: 924-928.

- Marzocca, M., Marucci, P., Sica, M., Alvarez, E. (2004). Detección de *Listeria monocytogenes* en distintos productos alimenticios y en muestras de ambientes de una amplia cadena de supermercados de la ciudad de Bahía Blanca, Argentina. *Revista Argentina de Microbiología* 36: 179-181
- Muñoz A. I., Vargas M., Otero L., Díaz G., Guzmán V. (2011). Presencia de *Listeria monocytogenes* en alimentos listos para el consumo, procedentes de plazas de mercado y delicatessen de supermercados de cadena, Bogotá, D.C, 2002-2008. *Biomédica* 31:428-39
- Myers, K., Cannon, J., Montoya, D., Dickson, J., Lonergan, S., Sebranek, J. (2013). Effects of high hydrostatic pressure and varying concentrations of sodium nitrite from traditional and vegetable based sources on the growth of *Listeria monocytogenes* on ready-to-eat (RTE) sliced ham. *Meat Science*, 94, 69–76
- Rubio, B., Martinez, B., Garcia-Cachan, M. D., Rovira, J. Jaime, I. (2007). Effect of high pressure preservation on the quality of dry cured beef “Cecina de Leon”. *Innovation Food Science and Emerging Technologies*, 8(7), 102-110.
- Vitas, A.I., Aguado, V., García-Jalón, I. (2004). Occurrence of *Listeria monocytogenes* in fresh and processed foods in Navarra (Spain). *International Journal of Food Microbiology*, 90, 349–356.